

苹果白兰地发酵酵母菌株的筛选及其性能研究

侯格妮, 吴天祥

(贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 以在云贵高原上所种植的青苹果为研究对象, 从其自然发酵醪中分离得到 10 株菌种。通过产气能力、耐性试验、产酒精试验三级筛选得到 1 株适合苹果白兰地发酵的酵母菌, 命名为 GN-1。结果表明, 该酵母菌可耐受 16 %vol 乙醇, 可耐糖浓度为 750 g/L, 发酵初始糖度为 14 °Bx, 发酵液的酒精度为 8.3 %vol; 该酵母菌发酵性能的试验结果显示, 其最适生长温度为 34 °C, 最适生长 pH 值为 4.0~6.0。

关键词: 苹果白兰地; 酵母菌; 筛选

中图分类号: TS262.38; TS261.1; TS261.4; Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2013)06-0014-04

Screening of Yeast Strains for the Fermentation of Apple Brandy and Study of Its Properties

HOU Geni and WU Tianxiang

(School of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: 10 strains were isolated from naturally fermented apple pulp (green apple planted in Yunnan-Guizhou plateau). Then through gas production capacity, tolerance test, and alcohol-producing three-level test, a yeast strain GN-1 suitable for the fermentation of apple brandy was finally screened out. Such strain displayed good resistance to high concentration alcohol (as high as 16 %vol) and high sugar (750 g/L). The initial sugar content at the beginning of the fermentation was 14 °BX and alcohol content of fermented apple pulp was 8.3 %vol. The experimental results revealed that the optimum growth temperature of GN-1 was at 34 °C and its best growth pH was 4.0~6.0.

Key words: apple brandy; yeast strain; screening

我国是世界上最大的苹果产地, 年总产量 2200 万 t, 超过世界总产量的 1/3。从世界水果深加工的有关数据情况来看, 全球每年用于加工的苹果数量占总产量的 23 % 左右, 发达国家的苹果深加工量超过总产量的 50 %, 甚至达到 75 %, 但我国用于深加工的苹果量仅占总产量的 12 % 左右。由于我国苹果品质普遍不高, 作为直接食用的鲜果在许多地区出现饱和, 低廉的苹果价格导致果农卖果的困难日趋严重, 直接损害了广大果农的经济利益, 在政府和经济两个层面上阻碍了苹果产业的可持续发展。因此, 苹果深加工产业链的延长、提高苹果产业附加值的瓶颈问题亟待解决^[1,2]。

水果白兰地能预防感冒、心血管疾病、肺病, 具有利尿和滋补等作用。近年来, 随着社会的发展和人们生活水平的提高, 国人的饮酒习惯也悄然发生改变, 优质白兰地逐渐成为消费热点。苹果白兰地在国外已有较成熟的加工工艺, 将水果加工成白兰地的产品方案本身就是最佳

的水果保藏方法之一, 这个方案应受到足够的重视^[2]。然而苹果汁的发酵过程是个复杂的变化体系, 涉及到许多方面的影响因素, 优良的酵母菌种是酿酒的基础和关键性因素^[3]。为了获得适合酿造苹果白兰地的酵母菌, 使其充分适应苹果的原料特点, 本试验从苹果自然发酵产物中进行分离筛选, 获得 1 株适宜苹果白兰地发酵的菌株, 并对其生长特性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

原料: 云南昭通青苹果;

菌株分离培养基: 麦芽汁培养基;

菌株筛选培养基 (YPD 液体培养基): 葡萄糖 20 g, 酵母膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 定溶于 1 L 水中, 115 °C 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

基金项目: 贵州农业产业化果品开发产学研合作项目 (HX201203)。

收稿日期: 2013-01-23

作者简介: 侯格妮 (1987-), 女, 陕西宝鸡人, 在读硕士研究生, 研究方向为食品加工, E-mail: hounini0422@yahoo.cn。

通讯作者: 吴天祥 (1965-), 男, 贵州贵阳人, 博士, 教授, 研究方向为发酵工程, E-mail: wutianxiang0808@yahoo.cn。

优先数字出版时间: 2013-03-15; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20130315.1531.006.html>。

1.2.1 菌株的分离

取苹果,经过清洗、破碎和打浆后,调整果浆糖度为 14°Bx , $\text{pH}4.0$,果胶酶添加量为 $4\text{ g}/100\text{ kg}$,于 25°C 发酵约 10 d 。在自然发酵的前期、中期、后期、末期分别取发酵后果汁的酵母液进行 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 共5个稀释度稀释。取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 菌悬液分别涂布于麦芽汁琼脂平皿上, 25°C 培养3 d后镜检,标号并挑取分离好、典型的酵母菌落于麦芽汁平皿上划线培养3~4次,直至镜检单菌落为纯菌落为止^[4]。

1.2.2 菌株的筛选

1.2.2.1 酵母菌产气、发酵气味及凝聚性测试

将经分离培养后的酵母菌按5%的量接种于YPD培养基中,用杜氏发酵管测定产气情况,并对酵母菌在发酵气味和凝集性的性能进行初步筛选。要求该菌株能在48 h内产气,发酵气味无酸败味且凝集性良好。以上实验平行重复3次^[3,5,6]。

1.2.2.2 酵母菌耐性试验

将一级筛选出待测酵母菌株接种于YPD液体培养基中,分别以不同浓度的葡萄糖($500.0\sim 750.0\text{ g/L}$ 共5个梯度)、乙醇($8.0\%\text{vol}\sim 16.0\%\text{vol}$ 共5个梯度)、 pH 值($1.5\sim 3.5$ 共5个梯度)以及不同温度($18\sim 46^{\circ}\text{C}$ 共5个梯度)处理48 h,观察杜氏管中气泡情况。以上试验平行重复3次。

1.2.2.3 酵母菌产酒度试验

将初筛后表现较好的酵母菌按5%的量接种于 14°Bx , $\text{pH}4.0$ 的600 mL苹果浆中,于 25°C 下发酵7 d,测各菌株发酵的发酵液中酒精的含量。酒精度按GB/T 15038—2006葡萄酒、果酒通用试验方法进行测定。

1.2.3 酵母菌发酵性能研究

1.2.3.1 最适生长温度测定

将酵母菌接入麦芽汁中,分别在 $18\sim 37^{\circ}\text{C}$ 不同温度下恒温培养12 h,于660 nm测定培养液OD值,依据OD值大小确定其最适生长温度^[6-7]。

1.2.3.2 最适生长pH值测定

将酵母菌接入不同pH值麦芽汁中,于最适生长温度下恒温培养12 h,再于660 nm测定培养液OD值,依据OD值大小确定其最适生长pH值。

1.2.3.3 生长曲线测定

将酵母种子液以2%添加量接入麦芽汁中,调整到选育酵母的最适pH值。在最适生长温度下以120 r/min于摇床上振荡培养,每隔2 h测定培养液于660 nm处的OD值,制作生长曲线。

2 结果与分析

2.1 酵母菌产气、发酵气味及凝聚性测试

通过1.2.1所述方法,从麦芽汁培养平板上分离出30株菌株作为酵母菌筛选试验的出发菌株。首先采用杜氏管发酵法进行一级筛选,研究结果表明,在30株菌株中,有部分菌株不发酵,筛选出在48 h内产气的9株菌株,表明这9株菌起酵能力较强,其起发时间和发酵速度等实验结果见表1。

表1 酵母初步筛选结果

菌株编号	起发时间(h)	发酵速率	发酵气味	凝聚性
GN-1	12	+++	淡香	好
GN-2	20	+	有酸味	一般
GN-5	36	++	淡香	良好
GN-13	14	++	正常	一般
GN-14	16	++	酒香	一般
GN-17	15	+++	有酒味	好
GN-26	20	+	正常	一般
GN-28	18	+++	有酸味	好
GN-29	37	+	淡香	良好

注:1.起发时间本实验以产气至杜氏管1/4计。2.发酵速率:+++表示从起发时间起4 h之内所产气体充满杜氏管;++表示从起发时间起8 h之内所产气体充满杜氏管;+表示从起发时间起12 h之内所产气体充满杜氏管;+-表示从起发时间起12 h之后所产气体充满杜氏管(以下相同)。

表1结果表明,有3株酵母起发时间在 $10\sim 15\text{ h}$ 之间,4株在 $16\sim 25\text{ h}$ 之间,2株在 $26\sim 48\text{ h}$ 之间。有3株菌在4 h内产气充满杜氏管,3株需8 h,3株需12 h。在2 d内还未产气的酵母菌,其发酵度一般不能满足白兰地的酿造要求,筛选过程中应将其舍弃。因此,保留表中这9株酵母菌作为出发菌株进行下一级筛选。

2.2 酵母菌耐性试验

2.2.1 酵母菌株的耐葡萄糖能力

将以上9株酵母菌分别做耐葡萄糖试验,葡萄糖浓度分别为 500 g/L 、 600 g/L 、 650 g/L 、 700 g/L 、 750 g/L 。筛选结果见表2。

表2 供试酵母菌株的葡萄糖耐受实验结果

菌株编号	葡萄糖浓度(g/L)				
	500	600	650	700	750
GN-1	+++	+++	++	++	++
GN-2	+++	+++	+++	++	+-
GN-5	+++	+++	+++	+	+-
GN-13	+++	+++	++	+	+-
GN-14	+++	+++	++	+	+-
GN-17	+++	++	++	+	+-
GN-26	+++	+++	++	++	+
GN-28	+++	+++	+	+	+-
GN-29	+++	++	++	+	+-

注:+++表示旺盛生长;++表示生长良好;+表示可以生长;+-表示微弱生长。

由表2可以看出,9株菌在 500 g/L 和 600 g/L 下均生长良好,在 650 g/L 、 700 g/L 浓度下均能生长;GN-1、GN-2和GN-26在 750 g/L 下也能生长,而GN-5、GN-

表3 供试酵母菌株在不同 pH 值下生长结果

菌株号	pH 值									
	3.5		3.0		2.5		2.0		1.5	
	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率
GN-1	10	+++	10	+++	10	+++	15	++	18	++
GN-2	19	+-	19	+	19	+	19	+	19	+
GN-5	36	+-	44	+-	-	-	-	-	-	-
GN-13	12	++	12	++	12	++	16	++	16	+-
GN-14	16	++	16	+	16	+	16	+	16	+-
GN-17	17	++	17	+	17	+	17	+	22	+
GN-26	23	+	23	+-	24	+-	22	+	24	+
GN-28	19	+	19	++	16	+	16	++	19	++
GN-29	25	+-	37	+-	37	+-	40	+-	40	+-

表4 供试酵母菌株耐酒精实验结果

菌株号	8 %vol 酒精		10 %vol 酒精		12 %vol 酒精		14 %vol 酒精		16 %vol 酒精	
	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率
GN-1	13	+++	13	+++	13	+++	13	+++	15	+-
GN-2	36	+-	36	+-	68	+-	-	-	-	-
GN-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GN-13	13	+++	14	++	16	++	16	++	15	++
GN-14	17	+	17	+	18	+-	38	+-	18	+-
GN-17	17	+	15	+	17	+	20	+-	20	+-
GN-26	47	+-	36	+-	42	+-	42	+-	68	+-
GN-28	45	+-	-	-	-	-	-	-	-	-
GN-29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: -表示在 48 h 内不生长(以下相同)。

表5 供试酵母菌株的耐温实验结果

菌株号	18 ℃		25 ℃		32 ℃		39 ℃		46 ℃	
	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率	起发时间(h)	发酵速率
GN-1	16	++	12	+++	11	+++	9	+++	-	-
GN-2	39	+-	20	+	20	+	12	++	-	-
GN-5	-	-	16	++	30	++	-	-	-	-
GN-13	15	+++	14	++	12	+++	12	++	-	-
GN-14	20	+-	16	++	12	++	16	+	-	-
GN-17	26	+-	15	+++	14	++	47	+-	-	-
GN-26	39	+-	20	+	17	+	17	+	-	-
GN-28	36	+	18	+++	17	+	47	+-	-	-
GN-29	-	-	37	+	34	++	36	+-	-	-

13、GN-14、GN-17、GN-28、GN-29 在 750 g/L 下生长较差。

2.2.2 酵母菌株的耐酸能力

将以上 9 株酵母菌分别做耐 pH 值试验, 梯度分别为 pH3.5、pH3.0、pH2.5、pH2.0 和 pH 1.5。杜氏管发酵结果见表 3。

表 3 结果表明, 大部分酵母能广泛适应酸性环境。其中 GN-1 耐酸性最好, 在 10 h 内产气, 且产气速率比较快; GN-13、GN-14、GN-17 耐酸性较好, 均能在 12~17 h 内产气; 而 GN-5 耐酸性差。

2.2.3 酵母菌株的耐乙醇能力

用以上 9 株酵母菌分别做耐乙醇试验, 乙醇浓度分

别为 8 %vol、10 %vol、12 %vol、14 %vol、16 %vol, 实验结果见表 4。

由表 4 可知, GN-1、GN-13、GN-14、GN-17 的耐酒精能力好, 均能耐受 8 %vol~16 %vol 的乙醇, GN-26 在 5 个梯度下生长缓慢, 耐乙醇能力一般, 其余菌株耐乙醇能力差。

2.2.4 酵母菌株的耐温能力

将以上 9 株酵母菌分别做耐温试验, 温度梯度分别为 18 ℃、25 ℃、32 ℃、39 ℃、46 ℃, 结果见表 5。

由表 5 可知, 在 48 h 内, GN-5 和 GN-29 在 18 ℃下不生长, 所有菌株在 46 ℃下不生长。GN-1、GN-2、GN-13 和 GN-14 在 39 ℃下生长快速。

综合耐性试验结果表明:9株酵母的耐葡萄糖差异不大;GN-1、GN-13、GN-14、GN-17的耐酸能力较好,产气起发时间快,发酵速率快;GN-1、GN-13、GN-14、GN-17的耐酒精能力好,均能耐受8%vol~16%vol乙醇;GN-1、GN-13、GN-14、GN-17均能耐受39℃的高温。综合各个因素考虑,选用GN-1、GN-13、GN-14、GN-17继续做下一步试验。

2.3 酵母菌株的产酒精试验

将上述经耐受性试验的菌株进行综合筛选,GN-1、GN-13、GN-14和GN-17表现良好,分别用这4株菌按5%的量接种于600 mL、14°Bx、pH4.0的苹果浆中,于25℃发酵7 d,测各菌株发酵产物的酒精含量,结果见表6。表6结果表明,GN-1产酒精度相对最高,因此,选择GN-1作为苹果白兰地的发酵菌株。

表6 产酒度筛选

项目	菌株			
	GN-1	GN-13	GN-14	GN-17
酒精度(%vol)	8.3	8.1	7.11	7.24
香味	平淡	酱味	酒香	正常

2.4 酵母菌生长特性

2.4.1 选育酵母最适生长温度

将酵母菌GN-1接入自然pH值的麦芽汁培养基中,在不同温度下培养,测定其生长温度曲线,结果见图1。由图1可以看出,GN-1的最适生长温度范围为31~37℃,最适生长温度为34℃。

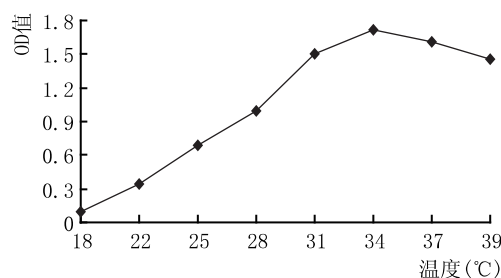


图1 GN-1的生长温度曲线

2.4.2 选育酵母最适生长pH值

将酵母菌GN-1接入不同pH值的麦芽汁培养基中培养,测定其生长曲线,结果见图2。由图2可以看出,GN-1的最适生长pH值范围为4.0~6.0,说明其具有耐受苹果浆天然pH值的特性,是适宜苹果白兰地发酵的菌株。

2.4.3 选育酵母生长曲线

按1.2.3.3测定方法对选育菌株进行培养,制作该菌株的生长曲线,结果见图3。

由图3可以看出,GN-1在2 h后进入对数期,菌量

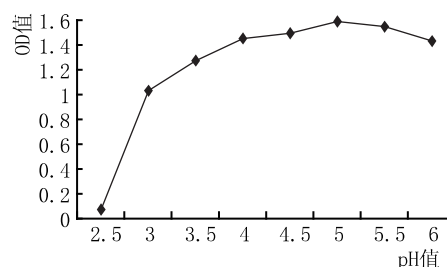


图2 GN-1的生长pH值曲线

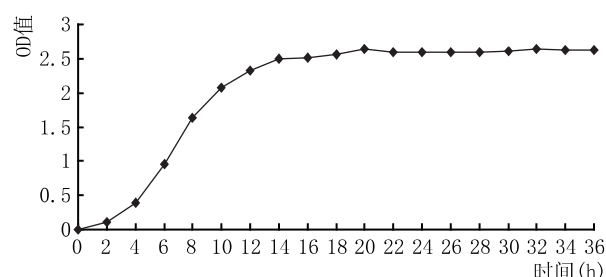


图3 GN-1的生长曲线

增加迅速,14 h后进入稳定期,菌体数量基本稳定。因此,在发酵生产接入菌种时,应该选择培养14 h后的种子液接入果浆。

由以上GN-1生长特性研究结果可知,用麦芽汁培养基制备种子液时,控制培养基pH值为5.0左右,在34℃下摇瓶培养12~16 h后即可。

3 讨论

从自然发酵的苹果浆中分离得到1株酵母,命名为GN-1。该酵母菌株在YPD中起酵较快,发酵能力强,产酒精度高。该酵母的最适生长温度为34℃,最适生长pH值为4.0~6.0。可耐受16%vol乙醇,可耐糖为750 g/L,是一株优良的苹果白兰地酿造酵母。

参考文献:

- [1] 黄洁.苹果、大枣白兰地的生产工艺研究[D].西安:西北大学,2001:1-62.
- [2] 高晓娟.苹果白兰地与苹果醋的联合生产工艺研究[J].山东轻工业,2010(1):82.
- [3] 郭志刚.甘肃野生酵母菌株发酵特性评价及产地葡萄酒酿造研究[D].兰州:甘肃农业大学,2008:1-64.
- [4] 孙家平.蓝莓果酒发酵菌株的筛选及固定化技术的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2009:1-65.
- [5] 李兰,许桂芳,张连苹.石榴酒酵母的筛选[J].酿酒科技,2010(11):44-47.
- [6] 方亮,吴文龙.黑莓果酒发酵菌株的筛选和性能初探[J].酿酒科技,2011(8):8-10.
- [7] 申彤,杨洁,陈红征.哈密瓜酿酒酵母的筛选及特性研究[J].酿酒科技,2003(3):48-50.